

PRODUCTION OF SINGLE-STRAND FV ANTIBODY

Patent Number: JP9220092
Publication date: 1997-08-26
Inventor(s): EKIDA TEIJI; YASUKAWA KIYOSHI; IMANAKA TADAYUKI; TAKAGI MASAHIRO
Applicant(s): TOSOH CORP
Requested Patent: JP9220092
Application Number: JP19960027622 19960215
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09; C12N1/21; C12P21/08
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject antibody containing a part essential for binding to an antigen, useful for immunological diagnosis, separation, purification, etc., in good productivity by solubilizing a single-strand Fv antibody expressed as an inclusion body in Escherichia coil, and subsequently holding the solubilized antibody.

SOLUTION: This method for producing a single-strand Fv antibody comprises binding an antigen (e.g. T3) to bovine serum albumin (BSA), etc., immunizing a BALB/c mouse with the bound antigen, fusing the splenic cells of the mouse to myeloma cells in the presence of polyethylene glycol, etc., selectively culturing the fused cells in a HAT culture medium, cloning the cultured cells, extracting mRNA from the obtained hybridoma capable of producing an anti-T3 antibody, producing a cDNA from the mRNA by a conventional method, cloning the cDNA with a primer to select a DNA having the H chain V region VH and L chain V region VL of the anti-T3 antibody, inserting the DNA into a vector, transforming Escherichia coil with the plasmid, expressing the single-strand Fv antibody as an inclusion body in the Escherichia coil, modifying the obtained single-strand Fv antibody and subsequently holding the solubilized antibody. Thus, the objective single-strand Fv antibody to which VH and VL are bound through linkers is obtained in good productivity.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-220092

(43) 公開日 平成9年(1997)8月26日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21			1/21	
C 1 2 P 21/08			C 1 2 P 21/08	
// (C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-27622

(22) 出願日 平成8年(1996)2月15日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 駅田 倭二

神奈川県相模原市相模大野7-37-17-201

(72) 発明者 保川 清

神奈川県相模原市相模大野7-37-17-401

(72) 発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2-28-11

(72) 発明者 高木 昌宏

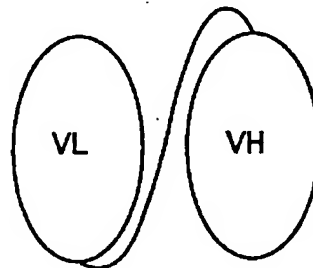
大阪府吹田市青山台1-3 C58-207

(54) 【発明の名称】 1本鎖Fv抗体の製造法

(57) 【要約】

【課題】 1本鎖Fv抗体の発現は種々報告されているが、いずれも生産性が低いという問題がある。

【解決手段】 大腸菌によってインクルージョンボディとして発現させた抗T3-1本鎖Fv抗体を、塩酸グアニジンにより変性させ、さらにフォールディングさせて、1本鎖Fv抗体を得る。また大腸菌によってシャペロニンと抗gp130-1本鎖Fv抗体とを共発現させ、1本鎖Fv抗体を可溶性画分として発現させて、1本鎖Fv抗体を得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】大腸菌によってインクルージョンボディとして発現させた1本鎖Fv抗体を、変性により可溶化させ、さらにフォールディングさせることを特徴とする、1本鎖Fv抗体の製造法。

【請求項2】大腸菌によってシャペロニンと1本鎖Fv抗体とを共発現させることにより、1本鎖Fv抗体を、可溶性画分として発現させることを特徴とする、1本鎖Fv抗体の製造法。

【請求項3】1本鎖Fv抗体が、配列番号1で表される抗T3抗体である請求項1または請求項2に記載の製造法。

【請求項4】1本鎖Fv抗体が、配列番号2で表される抗gp130抗体である請求項1または請求項2に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、1本鎖抗体の製造法に関するものである。さらに詳しくは、大腸菌により1本鎖Fv抗体をインクルージョンボディとしてまたは可溶性画分として発現させる方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】抗体は分子量が10万を越える巨大分子であるが、このうち抗原との結合に寄与している部分はV領域（可変領域）と呼ばれ、H鎖（長鎖）のV領域（分子量約1万）とL鎖のV領域（分子量約1万）とから構成されている。本発明の1本鎖Fv抗体とは、図1に示すようにH鎖のV領域とL鎖のV領域とを適当なリンカーでつないだものであり、もとの抗体分子全体のうち、主に抗原との結合性に必須の部分から構成された分子量約2万の蛋白質である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】近年、1本鎖Fv抗体の発現が種々報告されているが（Pluckthun, Biotechnology, 9, 545, 1991年参照）、いずれも大腸菌のペリプラズムに発現させる方法をとっており、生産性が低いという問題がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、1本鎖Fv抗体の発現について鋭意研究した結果、本発明に到達した。

【0005】即ち本発明は、大腸菌によってインクルージョンボディとして発現させた1本鎖Fv抗体を、変性により可溶化させ、さらにフォールディングさせることを特徴とする、1本鎖Fv抗体の製造法である。また本発明は、大腸菌によってシャペロニンと1本鎖Fv抗体とを共発現させることにより、1本鎖Fv抗体を、可溶性画分として発現させることを特徴とする、1本鎖Fv抗体の製造法である。

【0006】以下に本発明を更に詳しく説明する。

【0007】本発明で提供される1本鎖Fv抗体は、図1のような構造をもつ。すなわち、H鎖のV領域とL鎖のV領域がリンカーで結合されたものである。このリンカーは、好ましくは10から30、さらに好ましくは15から25のアミノ酸から構成されるものである。H鎖のV領域とL鎖のV領域は、どちらがN末端側に位置していてもよい。また、リンカーの配列としては、特に限定はなく、配列番号3に記載の配列が例示されるが、その他の配列でもよい。

【0008】本発明の1本鎖Fv抗体を大腸菌によって発現させるために必要なベクター系は、1本鎖Fv抗体の遺伝子以外に、遺伝子を発現（転写）させるためのプロモーター／オペレーター、遺伝子の発現（転写）を終了させるためのターミネーター、宿主細胞中での複製のための遺伝子等、他の遺伝子配列を含んでいても良い。

【0009】本発明では、大腸菌によってインクルージョンボディとして発現させた1本鎖Fv抗体を変性により可溶化させ、更にフォールディングさせる。変性の方法に特に限定はなく、加熱、超音波、変性剤などがあげられる。以下に変性剤を用いた変性-可溶化-フォールディングの方法を例示する。

【0010】大腸菌によってインクルージョンボディとして発現した1本鎖Fv抗体を、例えば8M塩酸グアニジンを用いて変性させ、それから徐々に塩酸グアニジンの濃度を下げてフォールディングさせる。変性剤としては、塩酸グアニジンのほかに、尿素やイソチオシアネート、界面活性剤等が例示できる。また、変性剤の濃度を徐々に下げる方法としては、サンプルを透析し外液を変えていく方法や、サンプルに直接溶液を加え、変性剤の濃度を下げていく方法が例示できる。

【0011】このようにして、1本鎖Fv抗体はフォールディングさせることができる。

【0012】一方、本発明において大腸菌によってシャペロニンと1本鎖Fv抗体とを共発現させる方法は、1本鎖Fv抗体を発現させるプラスミドとシャペロニンを発現させるプラスミドとを両方保持する大腸菌を樹立し、これを培養して共発現させる方法があげられる。また、1本鎖Fv抗体とシャペロニンの両方を発現できるようなプラスミドを作製し、これを導入した大腸菌を培養し共発現させる方法でもよい。即ち、大腸菌レベルでシャペロニンと1本鎖Fv抗体とが同時に発現するものであれば、由来するプラスミドは同じであっても異なっていてもよい。また、使用するシャペロニンは、大腸菌由来のシャペロニンGroESLの他に、真核生物由来のシャペロニン、例えばHSP47などを使用することができる。

【0013】上述の2つの1本鎖Fv抗体の製造法は、どのような抗原を認識する抗体であっても適用できるものである。例えば蛋白、糖、脂質、核酸、有機化合物などを認識する抗体の製造に利用することができる。

【0014】一例をあげると、T3はトリヨードサイロニンの略称で、それ自体甲状腺ホルモンとして構造や機能がよく知られているものである。本発明の製造法によって提供される抗T3抗体として、1本鎖Fv型抗T3抗体TT1が例示される。このTT1の配列は、配列番号1で表されるものであるが、これらのうち数個から数十個のアミノ酸配列が付加、欠失、または置換した配列であってもよい。なお、TT1については、特願7-274012に詳しく記載されている。

【0015】一方gp130は、インターロイキン-6等のサイトカインのシグナルを伝達する膜蛋白質として、それ自体構造や機能がすでに報告されている(Hibiら、Cell, 63, p1149, 1990年参照)。本発明の製造法によって提供される抗gp130抗体として、1本鎖Fv型抗gp130抗体GPX7が例示される。このGPX7の配列は、配列番号2で表されるものであるが、これらのうち数個から数十個のアミノ酸配列が付加、欠失、または置換した配列であってもよい。なお、GPX7については、特開5-304986号公報に詳しく記載されている。

【0016】

【発明の効果】本発明で提供される大腸菌1本鎖Fv抗体の製造法により、大腸菌1本鎖Fv抗体を大量に生産することができる。このことは、大腸菌1本鎖Fv抗体を免疫診断や分離精製手段として用いることにより、従来、抗体の一定領域に由来する副反応を抑えることができ、基礎研究や診断薬治療薬開発に大きな意義をもつものである。

【0017】

【実施例】以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0018】実施例1 抗T3抗体TT1の遺伝子単離と一本鎖Fv発現プラスミドの作製。

【0019】TT1は、特願7-274012に記載されている方法に従って製造した。すなわち、T3をBSAに結合させたものをBALB/cマウスに免疫し、脾臓細胞とミエロマとをポリエチレングリコールを用いる通常の方法で細胞融合させ、HAT培地選択及び抗原への反応性を確認した後に限界希釈法によりクローニングを行い、抗T3モノクローナル抗体TT1(IgGクラス)産生ハイブリドーマを作製した。

【0020】次に、RPMI1640で培養した1×10⁶個のTT1ハイブリドーマから、mRNA抽出キット(ファルマシア製)により、TT1ハイブリドーマのmRNAを調製し、常法に従ってcDNAを調製した。

【0021】次に、このcDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマー-VHBT3SC(配列番号4)及びVHFT3SC(配列番号5)を用いてPCR(条件: 94℃1分、55℃2分、72℃2分、25サイク

ル)を行って、抗体のH鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。一方、同cDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマー-VLBT3SC(配列番号6)及びVLFT3SC(配列番号7)を用いてPCR(条件: 94℃1分、55℃2分、72℃2分、25サイクル)を行って、抗体のL鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。

【0022】次に、上記2種類の増幅DNAを混合し、アニーリングと伸長反応(条件: 94℃1分、64℃4分、7サイクル)を行い、生成物(L鎖V領域-H鎖V領域)を鋳型として上記オリゴヌクレオチドプライマー(VLBT3SC、VHFT3SC)を用いてPCR(94℃1分、55℃2分、72℃2分、25サイクル)を行った増幅物は直ちにPCR産物挿入用ベクターpCRII(インビトロジェン)に挿入し、スクリーニングを経て目的DNA断片の挿入されたベクターを得た。

【0023】次に、このベクターDNAをFspIとBglIIで消化し、これをpET8c(ノバジェン社)(NcoI消化、Blunt処理、BamHI消化を順に行ったもの)に挿入した。

【0024】このようにして作製されたプラスミドにリンカー部位を以下の手順で挿入した。すなわち、リンカー部DNAとしてSCLB1(配列番号8)とSCLF1(配列番号9)をアニールし、上記プラスミド(BamHI消化とXhoI消化を行ったもの)に挿入し、最終的に大腸菌でのTT1(1本鎖Fv)抗体発現プラスミドpET8c-TT1scFvを作製した。また、pET8c-TT1scFvがコードするTT1の一本鎖Fvの1次構造及びそれをコードする核酸を配列番号1に示す。

【0025】実施例2 抗T3抗体TT1の発現とフォールディング。

【0026】pET8c-TT1scFvを大腸菌BL21(ノバジェン社)に導入し、プレートにまいた。翌日、1クローンを10mlのNZ培地に接種し、37℃で一晩培養した。翌日、上記培養液10mlを1リットルのNZ培地に接種し、37℃で培養した。OD660が0.3に達した段階(培養開始後約2時間)でIPTGを1mMになるように添加し、さらに2時間培養した。

【0027】次に、遠心で菌体を集め、30mM Tris-HCl, 30mM NaCl, pH8で2回洗った後、20mlの同溶液に懸濁した。超音波で菌体を破碎後、遠心を行いインクルージョンボディ及び可溶性画分を集め、SDS-PAGEにかけた。結果を図2に示す。図中、レーン1は菌体の可溶性画分、レーン2はインクルージョンボディである。矢印は1本鎖Fv型抗体TT1のバンドを示す。図2から明らかなように、TT1の一本鎖抗体はインクルージョンボディに発現してい

ることが確認された。

【0028】インクルージョンボディを10mlの2% Triton X, 10mM EDTA, pH8に懸濁し、再度超音波処理をした後、4℃で一晩放置した。

【0029】翌日、不溶性画分を遠心で集め、30mM Tris-HCl, 30mM NaCl, pH8で2回洗った後、10mlの同溶液に懸濁した。次に、蛋白質濃度が10μg/mlになるように450mlの30mM Tris-HCl, 30mM NaCl, pH8に希釈し、これを6M塩酸グアニジン、40mM Tris-HCl, pH8, 1mM DTTに透析した。4時間後、外液の半分を40mM Tris-HCl, pH8, 1mM DTTに交換した。同様に4時間以上経過後に外液の半分を40mM Tris-HCl, pH8, 1mM DTTに交換する操作を4回繰り返した後、最終的に外液を40mM Tris-HCl, pH8, 100mM NaClに置き換えた。4時間後サンプルを回収し、抗T3抗体TT1の一本鎖Fv標品とした。

【0030】抗T3抗体TT1の一本鎖Fv標品の、T3との結合性は以下の方法で確認した。即ちTT1の一本鎖Fv標品(10μg/ml、リン酸バッファに溶解)をマイクロタイタープレートに固相化し、BSAでブロッキングした。次に、アルカリフォスファターゼで標識したT3(特願7-274012参照)を加え、最後にアルカリフォスファターゼの基質を加え405nmの吸光度をイムノリーダーで測定した。結果を図3に示す。図中、プレート1は本試験を行ったもの、プレート2は対象として1本鎖Fv抗体標品を固相化しなかったプレートを用いたものである。

【0031】図3から明らかなように、TT1をコートしたウェルはTT1をコートしていないウェルと比較して、有意な差が認められた。これは、TT1の一本鎖Fv標品がT3と結合することを示すものである。

【0032】実施例3 抗gp130抗体GPX7の遺伝子単離と1本鎖Fv発現プラスミドの作製。

【0033】RPMI1640で培養した1×10⁶個のGPX7ハイブリドーマ(斎藤ら、J. Immunol. Methods, 163巻、p217, 1993年参照)から、mRNA抽出キットにより、GPX7ハイブリドーマのmRNAを調製し、常法に従ってcDNAを調製した。

【0034】次に、このcDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマー-VHBGPX7SC(配列番号10)及びVHFGPX7SC(配列番号11)を用いてPCR(条件: 94℃1.5分、54℃2.5分、72℃3分、30サイクル)を行い、抗体のH鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。一方、同cDNAを鋳型とし、別のオリゴヌクレオチドプライマー-VLBGPX7SC(配列番号12)及びVLFGPX7SC(配

列番号13)を用いてPCR(条件: 94℃1.5分、54℃2.5分、72℃3分、30サイクル)を行って、抗体のL鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。増幅したDNAはそれぞれpUCプラスミドにクローニングし、塩基配列を決定した。

【0035】次に、上記cDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチドプライマー-VHBGPX7SC(配列番号10)及びVHFGPX7SC(配列番号11)を用いてPCR(条件: 94℃2分、56℃2分、72℃2分、30サイクル)を行って、抗体のH鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。一方、同cDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマー-VLBGPX7SC(配列番号12)及びVLFGPX7SC(配列番号13)を用いてPCR(条件: 94℃2分、56℃2分、72℃2分、30サイクル)を行って、抗体のL鎖V領域をコードするDNA断片を増幅した。

【0036】次に、上記2種類の増幅DNAを混合し、アニーリングのためのPCR(条件: 94℃2分、56℃2分、72℃2分、30サイクル)を行った。

【0037】次に、アニーリングされたDNAをFspIとBglIIで消化し、これをpET8c(ノバジェン社)(NcoI消化、Blunt処理、BamHI消化を順に行ったもの)に挿入した。

【0038】このようにして作製されたプラスミドにリンカー部位を以下の手順で挿入した。すなわち、リンカー部DNAのSCLB2(配列番号14)とSCLF2(配列番号15)をアニーリングし、上記プラスミド(XhoI消化とMunI消化を行ったもの)に挿入し、最終的に大腸菌でのGPX7(1本鎖Fv)抗体発現プラスミドpET8c-GPX7scFvを作製した。また、pET8c-GPX7scFvがコードするGPX7の一本鎖Fvの1次構造及びそれをコードする核酸を配列番号2に示す。

【0039】実施例4 抗gp130抗体GPX7の1本鎖FvとシャペロニンGroESLとの共発現。

【0040】図6に示す方法により、抗gp130抗体GPX7の1本鎖FvとシャペロニンGroESLとの共発現ベクターpET-sFv-ESLを作製した。

【0041】次いで、pET-sFv-ESLを大腸菌BL21(ノバジェン社)に導入し、プレートにまいた。

【0042】翌日、1クロンを10mlのNZ培地に接種し、37℃で一晩培養した。翌日、上記培養液10mlを1リットルのNZ培地に接種し、37℃で培養した。OD660が0.3に達した段階(培養開始後約2時間)でIPTGを1mMになるように添加し、さらに2時間培養した。

【0043】次に、遠心で菌体を集め、30mM Tris-HCl, 30mM NaCl, pH8で2回洗った後、20mlの同溶液に懸濁した。超音波で菌体を破

碎後、遠心で不溶性画分及び可溶性画分を集めた。菌体の不溶性画分（レーン1）と可溶性画分（レーン2）とを用いてSDS-PAGEを行った結果を図5に示す。図中、矢印Aは発現したシャペロニンGroESL、矢印Bは発現した1本鎖Fv型GPX7のバンドを示す。図5から明らかなように、シャペロニンGroESLと共発現させることにより、可溶性画分にGPX7の1本鎖Fv抗体が検出された。このGPX7の1本鎖Fv抗体をマイクロタイタープレートに固相化し、アルカリホスファターゼで標識したgp130と反応させたとこ

ろ、GPX7の1本鎖Fv抗体はgp130と結合することが示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の1本鎖Fv抗体の構造を示す模式図である。

【図2】実施例2で行った、SDS-PAGEのバタ-

＊ンを示す図である。

【図3】実施例2で行った、マイクロタイタープレート1、2の吸光度を示す図である。

【図4】実施例4で行った、pET-sFv-ESLの作製手順を示す図である。

【図5】実施例4で行った、SDS-PAGEのバタ-

＊ンを示す図である。

【配列表】

配列番号：1

10 配列の長さ：735塩基

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

単離クローン名：ハイブリドーマTT1

配列

```

ATG GCA GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GTT GCA TCT 48
Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Val Ala Ser
1      5      10      15
CCC GGG GAG AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT CCC ACC TCA AGT ATA AGT 96
Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser
20     25     30
TCC AAT TAC TTG CAT TCG TAT CAG CAG AAG CCA GCA TTC TCC CCT AAA 144
Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys
35     40     45
CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGT GTC CCA ACT CCC 192
Leu Leu Ile Tyr Arg Tyr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg
50     55     60
TTC AGT GGC AGT GGG TCT GCG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC 240
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr
65     70     75     80
ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT 288
Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser
85     90     95
ATA CCG CTC ACG TTC GGT GCT GCG ACC AAG CTC GAG ATC GGT GGC GGT 336
Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gly
100    105    110
GCC TCG GCC GGT GGT GCG TCG GGT GCG GCG GGA TCC GAG GTC AAG CTG 384
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu
115    120    125
CAG GAG TCT GCG GGA GCG TTA GTG AAG CTT GCG GCG TCC CTG AAA CTC 432
Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly Ser Leu Lys Leu
130    135    140
TCC TGT GAA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGT TAT TAC ATG TCT TCG 480
Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Ser Trp
145    150    155    160
GTT CCC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG GAG TTG GTC GCA GCC ATT AAT 528
Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Ala Ile Asn
165    170    175

```

(6)

特開平9-220092

9 10

AGT AAT GGT GGT ACC ACC TAC TAT TCA GAC ACT GTG AAG GCC CGA TTC 576
 Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe

180 185 190

ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG ACC 624
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser

195 200 205

AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC TTG TAT TAC TGT GCA AGC CCG GTC 672
 Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Val

210 215 220

TCC TAT TAT TAC CTC TAT GTC ATG TAC TAC TGG GCC CAA CCG ACC ACC 720
 Ser Tyr Tyr Tyr Leu Tyr Val Met Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

225 230 235 240

GTC ACC GTC TCC TCA 735
 Val Thr Val Ser Ser

245

配列番号：2

配列の長さ：720塩基

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

* トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

* 単離クローン名：ハイブリドーマGPX7

配列

GAG CTC GTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA TTG ATA TCT GCA TCT CCA GGG 48
 Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ile Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

GAG AAG GTC ACC ATG ACC TCC AAT GTC AGC TCA AGT GTT ACT TCC ATG 96
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Asn Val Ser Ser Ser Val Thr Ser Met

20 25 30

TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT 144
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

CTC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT CCT CCC TCC AGT GGC AGT 192
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Ser Ser Gly Ser

50 55 60

GGG TCT GGG ACC ACT TAC TCT CTC ACA ATC AGC ACC TTG GAG GCT GAA 240
 Gly Ser Gly Thr Thr Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu

65 70 75 80

GAT GCT GCC ACT TAT TAC TCC CAG CAG TGG AGT ACT AAC CCG CTC ACC 288
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Asn Pro Leu Thr

85 90 95

TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTC GAG CTG GGT GGC GGT GCG TCG GGC GGT 336
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCG GAC GTC CAA TTG CAG CAG TCT GGA 384
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

115 120 125

CCT GAA CTG GTG AAG CCT GCG GCT TCA GTG AAG ATA CCC TGC AAG GCT 432
 Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala

130 135 140

TCA GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAC AAC ATG GAC TCG GTG AAG CAG ACC 480
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser

145 150 155 160

11
CAT GGA AAG AGC CTT GAG TCG ATT GGA GAT ATT AAT TCT CAT AGT GGT 528
His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Ser His Ser Gly
165 170 175
GGT ATT ATC TAC AAC CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATA TTG ACT GTA 576
Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val
180 185 190
GAT AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC GCC AGC CTG ACA TCT 624
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser
195 200 205
GAG GAC ACT GCA GTC TAT TAT TGT GCA AGA ACC TAC TAT GTG TAC GCC 672
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Tyr Tyr Val Tyr Gly
210 215 220
CAC TTC TTT GAC TAC TCG GCC CAA GCC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 720
His Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu The Val Ser Ser
225 230 235 240

配列番号: 3 ※ トポロジー: 直線状
配列の長さ: 15 配列の種類: ペプチド
配列の型: アミノ酸 *

配列
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

配列番号: 4 ※ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 29 トポロジー: 直線状
配列の型: 核酸 ※ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列
CCGCCCGCG ATCCGAGGTC AAGCTGCAG 29

配列番号: 5 ★ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 32 トポロジー: 直線状
配列の型: 核酸 ★ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列
CAGTGCAGCA GGAGTACTAT TTCTAGAATG CA 32

配列番号: 6 ☆ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 26 トポロジー: 直線状
配列の型: 核酸 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
鎖の数: 一本鎖
トポロジー: 直線状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列
ACGTATGCCG AGACATTGAG CTGACC 26

配列番号: 7 40 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 32 トポロジー: 直線状
配列の型: 核酸 ☆ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列
TCGAGATCGG TGGCGTGGC TCGGCGGTG GTGGTCGGG TGGCGCG 48

配列番号: 9 ◆ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 48 トポロジー: 直線状
配列の型: 核酸 ◆ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列
GATCCGCCGC CACCGACCC ACCACCGCCC GACCCACCGC CACCGATC 48

配列番号: 10 50 配列の長さ: 32

13

14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCAGATGTGA GCTCGTGATG ACCCAGACTC CA 32

配列番号：11

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCCTCTGAG TTAATAACAC TCTCCCTGT TGAA 34

配列番号：12

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

TCGAGCTGGG TGGCGTGCC TCGGCGGTG GTGGTCGGG TGGCGCGGA TCGGACGTCC 60

配列番号：15

配列の長さ：60

配列の型：核酸

配列

AATTGGACGT CCGATCCGCC GCCACCCGAC CCACCACGCC CCGAGCCACC GCCACCCAGC 60

* トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACGTGAATT CGACGTCCAG CTGCAGCAGT CTGG 34

配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGCTTGTGG ACACAATCCC TGGGCACAAT 30

配列番号：14

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

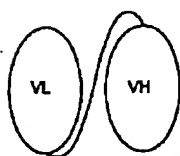
* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

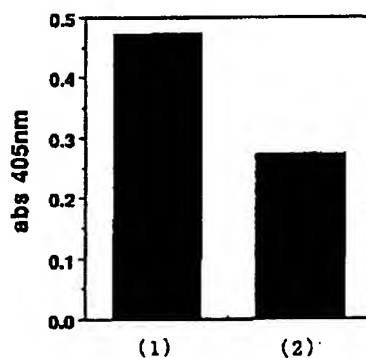
【図1】



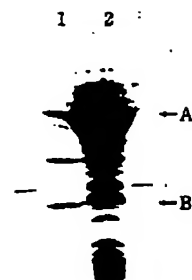
【図2】



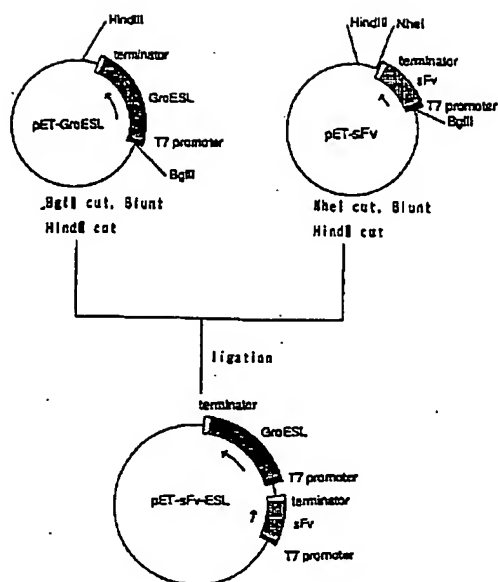
【図3】



【図5】



〔図4〕



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

(C12P 21/08

C12R 1:19)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所